

保加利亚乳杆菌高密度培养的初步研究

王奎明^{1,2}, 王昌禄¹, 陈铁涛¹, 张虎成², 杨秀旭², 曹晓梅², 陈薇²

1(天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津市食品营养与安全重点实验室, 天津, 300457)

2(军事医学科学院微生物流行病研究所 病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京, 100071)

摘要 对培养保加利亚乳杆菌的基础培养基进行优选, 确定为基础 MRS 培养基。然后优化培养条件: 发酵时间为 12h, 起始 pH 为 6.4, 发酵温度为 37℃。培养基: MRS 培养基 + 7.5% 番茄汁 + 12% 麦芽汁 + 5% 海带汁 + 2% 乳清。通过正交试验证明, 保加利亚乳杆菌菌体浓度可达到 1.0×10^{12} cfu/mL。

关键词 保加利亚乳杆菌, 发酵剂, 高密度培养

乳酸菌能赋予食品柔和的酸味和香气, 改进食品的品质和营养, 还具有维持微生态环境、抗突变、抗肿瘤、降血脂和提高免疫力等重要功能, 因此一直是食品界、医药界和微生物学界关注的热点。

根据酸奶发酵剂的起源以及目前酸奶发酵剂在发酵乳制品方面的应用情况, 可将发酵剂分为 3 种类型, 即天然发酵剂、普通发酵剂和浓缩发酵剂^[1]。

超浓缩乳酸菌发酵剂制备的关键是对其实行高活性、高密度培养^[2], 高密度培养技术也称高密度发酵技术 (high cell density culture, HCDC), 一般指在液体培养中的细胞密度超过常规培养 10 倍以上的生长状态, 达到提高菌体发酵密度的目的。这种培养优势在于缩短生产周期、减少设备投资从而降低生产成本, 能极大地提高产品市场竞争力^[3]。当前有报道的高密度培养数量级达到 10^{12} cfu/mL。

本文首先找到适合保加利亚乳杆菌生长的基础培养基, 确定其最佳的培养条件。在众多营养物质中找到合适的增强因子对培养基进行强化, 得到优化培养基, 然后通过流加碱中和实验, 使培养液保加利亚乳杆菌的浓度接近 10^{12} cfu/mL, 对乳酸菌高密度培养进行了初步探索。

1 材料与方法

菌种: 德士乳杆菌保加利亚亚种 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*) 1.1863, 中科院微生物所菌种保藏中心提供。

种子培养基: 葡萄糖 1%, 胰蛋白胨 1%, 牛肉膏 0.5%, 酵母膏 0.5%。

基础发酵培养基: 酵母粉 1%, 蛋白胨 1%, Glu-

cose 12%, $MgSO_4$ 0.02%, $MnSO_4$ 0.001%, K_2HPO_4 0.02%, NaCl 0.001%, $(NH_4)_2$ -Citrate 0.02%, CH_3COONa 0.05%, $CaCO_3$ 3%, 灭菌前 pH6.5。

计数培养基: 葡萄糖 2%, 酪蛋白胨 1%, 牛肉膏 1%, 酵母膏 1%, K_2HPO_4 0.2%, NaAc0.5%, $MgSO_4$ 0.05%, $MnSO_4$ 0.02%, 吐温 80 0.1 mL, 柠檬酸二胺 0.2%, 琼脂 2%, pH6.3~6.5。

缓冲体系: (A) 0.1 mol/L KH_2PO_4 与 0.1 mol/L K_2HPO_4 ; (B) 10% 柠檬酸与 10% 柠檬酸钠; (C) 5% 乙酸与 5% 乙酸钠; (D) 10% Na_2CO_3 。

酸度(滴定法)^[4]: 以吉尔涅尔度(°T)表示。

pH 值的测定: 采用 pH8-3C 精密酸度计及精密 pH 试纸。

乳酸菌活菌计数^[5]: 用血球计数板显微计数法和采用 MRS 培养基配方平板计数(根据国际乳品联合会标准 IDF117, 1983)。

OD 值的测量^[6]: 采用 VIS-7200 型可见分光光度计测定, 波长 OD₆₅₀。

2 结果与讨论

2.1 基础培养基的选择

一般来说, 脱脂乳和乳清是乳酸菌的最佳培养基, 实验表明, 单从菌落总数来说, 以乳清 + 6% 脱脂奶粉的乳清培养基最好^[8], 但考虑到喷雾干燥时不易进行菌体的分离浓缩。因此, 选择基础发酵培养基作为基础培养基进行成分强化。

2.2 *L. b* 菌生长曲线的测定

为了解 1.1863 菌在改良 MRS 培养液中的生长情况, 测定了其生长曲线, 把经过活化的菌种接入改良 MRS, 每 3h 进行 1 次活菌计数, 同时测定发酵液的滴定酸度、pH 值及 OD 值, 以便更准确地掌握其

第一作者: 在读博士研究生(陈薇为本文通讯作者)。

收稿日期: 2007-06-21, 改回日期: 2007-08-29

生长情况,变化情况如图1和图2所示。

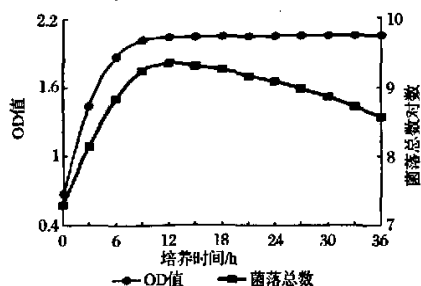


图1 *L. b* 菌的生长曲线

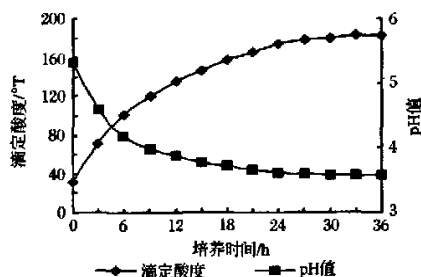


图2 *L. b* 菌的生长曲线

由图1和图2可以看出,保加利亚乳杆菌从一开始菌数急增,经过较短的延迟期后即进入对数生长期,9h达到高峰,以后则进入生长稳定期,此后菌数基本不再增加,并稍有下降,至21h下降的速度更快,进入衰亡期。OD值从一开始急增,到12h后达到高峰即基本保持不变,表明此后菌数不再增加,但与菌落对数曲线相比有一段差距,说明此后有一部分菌被自身所产生的代谢产物抑制甚至杀死了。

2.3 *L. b* 菌培养条件的确定

2.3.1 发酵温度

对*L. b* 1.1863的最适温度进行实验,结果见图3。

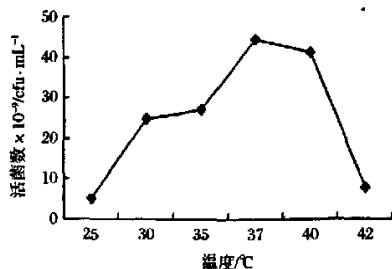


图3 不同温度对乳酸菌生长的影响

由图3可以看出,在37℃,菌液生长繁殖最旺盛。因此选择在37℃培养保加利亚乳杆菌。

2.3.2 培养基初始pH值的确定

用无菌 Na_2CO_3 溶液和乳酸溶液调节培养基的初始pH值,确定一系列pH值点。培养12h后测定发酵液中的活菌数,见图4。

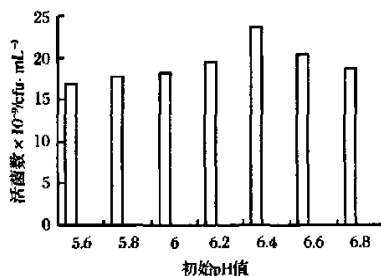


图4 初始pH值对*L. b* 1.1863生长的影响

从图4可以看出,初始pH值为6.40时,菌数最高。初始pH值过高或过低都不利于*L. b* 菌的生长。

2.3.3 接种量对乳酸菌生长的影响

将种子分别以1%、3%、5%、7%和9%的接种量接入发酵培养基中,测定活菌数,结果见图5

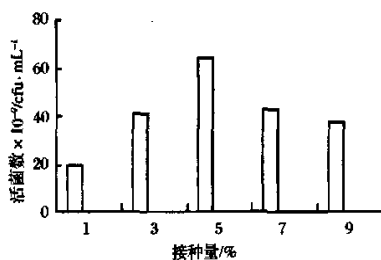


图5 接种量对菌体生长的影响

由图5可见,接种量为5%时菌体生长最好。

2.4 基础培养基优化

2.4.1 不同碳源对乳酸菌生长的影响

在培养基中分别加入蔗糖、葡萄糖、乳糖以及麦芽糖和乳糖的复合物,37℃培养16h后测定活菌数,结果见图6。

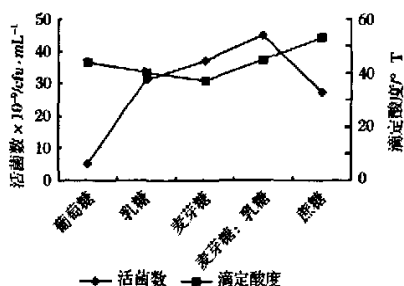


图6 不同碳源对乳酸菌生长的影响

实验结果表明,添加不同碳源对酸度和活菌数都有影响,其中添加麦芽糖时乳糖活菌数最高,葡萄糖

最低,而滴定酸度麦芽糖最低,蔗糖最高,说明使用不同碳源时乳酸菌的代谢产物不同,麦芽糖和乳糖结合可保证生长和一定的 pH 值,避免因酸度过低而对菌体生长的抑制作用。

2.4.2 不同氮源对菌体生长的影响

可用于乳酸菌培养的氮源种类很多,本实验主要使用了如图 7 所示的几种氮源,添加量 1%,结果见图 7。

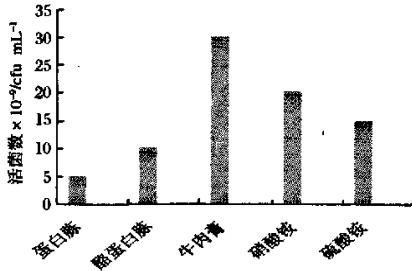


图 7 不同氮源对乳酸菌生长的影响

从图 7 中可以看出,使用牛肉膏时活菌数最高,所以选择牛肉膏作为最佳氮源。

2.4.3 缓冲体系的影响

表 3 缓冲体系对菌体生长的影响

编号	最适添加量/%	菌体量/cfu · mL ⁻¹
A	5	1.12×10^8
B	5	1.14×10^8
C	5	6.72×10^8
D	5	9.65×10^9

由表 3 中数据可以看出,缓冲液 A 和 B 增菌效果大致相当,D 增菌效果好一些。

由于 *L. b* 菌在生长繁殖过程中会产生引起培养基 pH 值改变的代谢产物乳酸等,如不适当的加以调节,就会抑制甚至杀死其自身。调节 pH 值的方法有 2 种:内源调节和外源调节^[9]。内源调节是指一次性加入缓冲盐体系,但由于 *L. b* 菌在生长过程中产酸过多,以致单靠内源调节无法维持正常的 pH 值,因此考虑用外源调节方式。即在发酵过程中流加碱以中和 *L. b* 菌发酵过程中产生的大量酸维持适宜的 pH 值。研究中尝试了在其生长过程中流加 20% Na_2CO_3 溶液以中和产生的酸,每隔 3h 测定 1 次活菌数,并调节 pH 值为 5.8,结果见图 8。

从图 8 可以看出,加碱中和试验样的菌数已接近 10^{10} cfu/mL,已明显高于其参照样,在 15h 达到最大值,达 9.5×10^{10} cfu/mL,且其生长稳定期维持较长,菌落生长抑制维持到 18h,而且其最佳收获期也随之延迟 6h。虽然菌数在 18h 以前一直在增长,但也不是无限增长。因为中和产生的乳酸盐同样对 *L. b* 菌

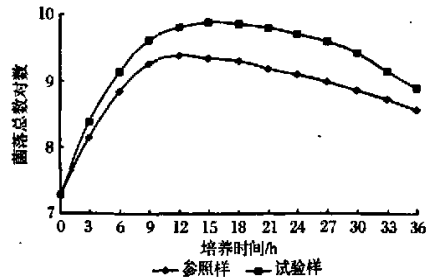


图 8 *L. b* 菌流加碱中和试验

的生长有抑制作用,至 24h,积累的乳酸盐已明显抑制其生长。

2.4.4 基础发酵培养基正交优化

在单因素实验基础上,对发酵培养基进行正交优化,最终确定乳酸菌浓缩发酵培养基为麦芽糖:乳糖(1:1)10%,酪蛋白胨 1%,牛肉膏 1%,酵母膏 1%, K_2HPO_4 0.2%,NaAc 0.5%, $\text{MgSO}_4 \cdot 0.05\%$, $\text{MnSO}_4 \cdot 0.02\%$,吐温 80 0.1mL、柠檬酸二胺 0.2%,pH6.3~6.5。

2.5 *L. b* 菌培养基的正交试验设计

乳酸菌是异养型微生物,营养要求复杂,需要多种生长促进因子。因此在此基础培养基中添加不同量的番茄汁、麦芽汁、海带汁和乳清等营养物质,以观察生长促进情况。

考虑到各生长刺激因子之间可能存在联合协同的交互作用,因而采用正交试验法。正交实验采取四因素三水平设计方法(以优化的发酵培养基添加),衡量指标以发酵液中的活菌数表示,采用正交试验分析表中的菌落总数为 3 次平行实验的平均数,具体因素水平项目设计及数据处理结果如表 6 所示。

表 6 正交试验分析表

试验号	番茄汁 /%	麦芽汁 /%	海带汁 /%	乳清 /%	菌落总数 $\times 10^{-9}/\text{个} \cdot \text{mL}^{-1}$
1	2.5	4	1	2	255
2	2.5	8	3	4	183
3	2.5	12	5	6	580
4	5	4	3	6	290
5	5	8	5	2	555
6	5	12	1	4	250
7	7.5	4	5	4	890
8	7.5	8	1	6	315
9	7.5	12	3	2	1515
<hr/>					
M_1	$M_{11}=1018$	$M_{12}=1435$	$M_{13}=820$	$M_{14}=2325$	$T=4835$
M_2	$M_{21}=1095$	$M_{22}=1053$	$M_{23}=1988$	$M_{24}=1323$	$Y=537$
M_3	$M_{31}=2720$	$M_{32}=2345$	$M_{33}=2025$	$M_{34}=1185$	
m_1	$m_{11}=339.3$	$m_{12}=478.3$	$m_{13}=273.3$	$m_{14}=775$	
m_2	$m_{21}=365.0$	$m_{22}=351.0$	$m_{23}=662.7$	$m_{24}=441$	
m_3	$m_{31}=906.7$	$m_{32}=781.7$	$m_{33}=675.0$	$m_{34}=395$	
R_j	$R_1=1702$	$R_2=1292$	$R_3=1205$	$R_4=1140$	
S_j	$S_1=615928.7$	$S_2=293698.7$	$S_3=313068.7$	$S_4=258072$	$S_T=1480768$

由表6可以看出,A、B、C、D四因素的交互作用影响比较显著,各因素对保加利亚乳杆菌的增菌效果影响大小顺序依次为:A>B>C>D。由试验结果优化的最佳增菌培养基配方为A₃B₃C₃D₁,按此组合配制的增菌液接种活化两代的保加利亚乳杆菌后的增菌效果在 1.0×10^{12} cfu/mL以上。确定营养物质的最佳组合,得到优化MRS培养基。

3 结论

(1) *L. b* 1.1863的最佳培养条件:培养温度37℃,培养基初始pH值为6.4,接种量为5%,采取厌氧培养。

(2) 通过*L. b*菌的流加碱中和实验,以10% Na₂CO₃溶液作中和剂,将培养液的pH值控制在6.4,培养15h时*L. b*菌的活菌数可达到 9.5×10^{10} cfu/mL。

(3) 对基础培养基进行强化,得到培养*L. b*菌的优化MRS培养基:基础MRS培养基+7.5%番茄汁+12%麦芽汁+5%海带汁+2%乳清。强化后,增菌效果在 1.0×10^{12} cfu/mL。

参考文献

1 Sandine W. Dairy starters reviewed[J]. Dairy Sci, 1977,

60:378

- 2 Osborne R. Bacterial starters cultures for foods[J]. Dairy Res, 1980, 47: 141
- 3 史媛英,肖冬光. 酸奶发酵剂高浓度培养的研究[J]. 天津轻工业学院学报, 1999, (1): 20~25
- 4 房兴利,晋津. 酸奶生产液体发酵剂的研究[J]. 中国乳品工业, 1994, 22(5): 207~208
- 5 吕兵,张国农,肖光辉. 新型酸奶发酵剂的研究[J]. 中国乳品工业, 1999, 27(5): 28~32
- 6 杜连祥,赵征,王昌禄. 乳酸菌及其发酵制品生产技术[M]. 天津:天津科学技术出版社, 1999. 11
- 7 WilNKonings, JanKok, OscarPKuipers, et al. Lactic acid bacteria: the bugs of new millennium[J]. Current Opinion in Microbiology, 2000, (3): 276~2821
- 8 黄良昌,吕晓玲,邢晓慧. 酸奶发酵剂的研究进展[J]. 广州食品工业科技, 2002, 17(3): 4
- 9 许本发,李宏建. 酸奶和乳酸菌饮料加工[M]. 北京:中国轻工业出版社, 1994. 7~8
- 10 Chamoagne C. Effect of medium on growth and subsequent survival of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* to freeze-drying[J]. J Industry Microbiology, 1991, (7): 147

The Primary Study on High Cell Density Culture of *Lactobacillus bulgaricus*

Wang Kuiming^{1, 2}, Wang Changlu¹, Chen Tietao¹,

Zhang Hucheng², Yang Xiuxu², Cao Xiaomei², Chen Wei²

1(School of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology,

Key Lab of Food Nutrition and Safety of Tianjin, Tianjin 300457, China)

2(Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

ABSTRACT The high cell density culture technique of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* was studied and the effects of cultural condition, such as temperature, inoculation, capacity, initial pH, and media composition, were discussed. The optimal culturing conditions were developed as follows: bases of MRS with addition of 7.5% tomato juice, 12% malt wort, 5% kelp juice and 2% whey. Then high cell density culture was carried out and the cell concentration of 1.0×10^{12} cfu/mL for 12hours was obtained under the optimal conditions.

Key words *Lactobacillus bulgaricus*, starter, high cell density culture